The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	副腎皮質コレステロール側鎖切断反応に関与する電子伝達系成分の精製及びそれらの分子的特性についての研究
Author(s)	杉山, 俊博
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31578
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏名・(本籍)	杉山俊博（すぎやま としひろ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3880 号
学位授与の日付	昭和52年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**副腎皮質コレステロール側鎖切断反応に関与する電子伝達系成分の精製及びそれらの分子的特性についての研究**
論文審査委員	(主査) 教授 山野 俊雄 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 萩原 文二

論文内容の要旨

〔目的〕

コレステロール側鎖切断反応は，種々のステロイドホルモン産生臓器に共通して見出されるもので，ステロイド生合成の律速段階をなすといわれる重要な反応である。この反応を触媒する酵素は，チトクロームP-450（以下P-450）と呼ばれ，いわゆる-原子酸素添加酵素で，NADPH-アドレノドキシン還元酵素（以下AdR）と，アドレノドキシン（以下Ad）とともに，還元型ピリジンヌクレオチドから分子状酸素に至る一連の電子伝達系を構成している。

著者は，この電子伝達系成分の配列と特性に注目し，Adを固定化することにより，他の二成分の単離，精製を試み，次いで各成分間の複合体形成に関する検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

1）Ad-アフィニティカラムの作成

BrCNで活性化したSepharose 6Bにゲル1mlあたり2mgのAdを結合させた。このようにして調整したAd-アフィニティカラム（2×10cm）は，4℃以下で保存すれば少なくとも1年間安定な状態でくり返し使用が可能であった。

2）AdRの精製及び性質

牛副腎皮質のミトコンドリア画分を 0.1Mリン酸カリウム（pH 7.4）中で破壊すると上清にAdRとAd が抽出された。この上清の硫安分画（0.3～0.6飽和）を透析したのち，Ad-アフィニティカラムにかけるとと AdRのみが特異的に吸着され，0.4MNaClで溶出された。本操作のみで比活性が約30倍上昇し，90%以上の純度の標品を得ることができた。さらに，Sephadex G-100 のゲルロ

過操作を行うと，六角板状の結晶を得ることができた。本酵素は分子量54,000で1モルのFADを含むフラビン酵素であった。

3）P-450の精製と性質

Triton X-100を用いてミトコンドリア破片膜を可溶化し，この上清をAd-カラムにかけると可溶化P-450のみが特異的に吸着された。0.6MNaClで溶出してきた標品をさらにSephadex G-200のゲルロ過を行ったところ，分子量がそれぞれ80万以上，40万，20万に相当する，少なくとも3種類の会合状態を示すピークがあらわれた。このうち20万の分子量に相当する画分のP-450が最も純度がよく，その含有量は10nmoles/mgタンパクであった。SDS-ゲル電気泳動法で単一バンドを示し，分子量を計算すると約54,000であった。分光スペクトルから，394 nmにピークを示す，いわゆる“高スピン型” P-450であった。この標品にTritonなどの表面活性剤，有機溶媒やアルコール類を添加すると“低スピン型” P-450に変換した。側鎖切断活性は，20α-ハイドロオキシコレステロールを基質にした時，5nmoles/P-450nmole/minであった。

4）電子伝達系成分相互間の複合体形成について

i）ゲルロ過による複合体形成の証明

AdとAdR及びP-450を共存させ，低イオン強度下でゲルロ過を行ったところ，AdRとAd及びP-450とAdという組み合わせの複合体形成が観察された。

ii）P-450の還元速度に対するAdの影響

精製したP-450標品に対するジチオナイト及び再構成系での還元速度を測定すると，それぞれ$4\times10^{-3}sec^{-1}$，$1.0sec^{-1}$であり，後者の方が250倍ほど速いことが分かった。さらに，後者による還元はP-450に特異的で，P-420は還元されなかった。

iii）P-450の分子的特性に対するイオン強度の影響

P-450標品は，高イオン強度下では，前述3）の如く，少なくとも3種類の会合状態をとっているものと考えられるが，低イオン強度下では，凝集して，巨大な集合体となった。これにAdを加えると低イオン強度下でも元の状態に戻った。また，あらかじめAdを加えておくと，低イオン強度下でも凝集は見られなかった。これらの結果から，P-450とAdはかなり強固な結合をしているものと考えられる。

〔総括〕

1）はじめて，AdをSepharoseに固定化して，安定なAd-アフィニティカラムを作成した。このカラムを用いて，アドレノドキシン還元酵素及びチトクロームP-450を，簡便に，かつ収率よく精製できた。さらに，前者の結晶化に成功した。

2）P 450の分子的特性としての，分光的，磁気的，物理化学的性質を明らかにした。

3）電子伝達系成分間の複合体形成能について，ゲルロ過，還元速度，分子の解離集合などの実験結果より，AdR—Ad及びAd—P-450という二組の複合体形式を証明した。

論文の審査結果の要旨

本論文においては，まず副腎皮質ミトコンドリアよりコレステロール側鎖切断反応に関与するNADPH-アドレノドキシン還元酵素とチトクロームP-450scc がアドレノドキシン固定化カラムを用いることにより高能率高収量で精製されることが報告されている。還元酵素は結晶化にはじめて成功したものでありこの精製法はきわめて独創的である。

精製された2標品を用い，それぞれの分子特性を検討した結果それぞれがアドレノドキシンと複合体を形成することを明らかにしている。とくに電子伝達系での酸化還元が複合体形成で著しく促進されることを発見し，アドレノドキシンが電子伝達系成分間の電子の授受に大きな役割を果している可能性を明らかにした。

これらの知見は副腎ステロイド生合成の研究に貴重な貢献をなすものとして高く評価される。